第 43 卷 增刊
2000 年 5 月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol.43, Suppl.
May, 2000

文章编号: 0454-6296 (2000) 增刊-0077-08

越冬松针瘿蚊幼虫整体携脂蛋白的分离和纯化

李毅平[1], 龚 和[1], 朴镐用[2]

(1. 中国科学院动物研究所, 农业虫鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100080;
2. 韩国科学技术院生命工学所昆虫资源室, 韩国大田 305-600)

摘要: 采用 KBr 密度梯度超速离心并结合常规 Sepharose CL-4B 凝胶柱层析, 从越冬松针瘿蚊 *Thecodiplosis japonensis* (Uchida *et* Inouye) 幼虫整体中, 分离并纯化了一种携脂蛋白。这是第二例从昆虫整体分离并纯化出携脂蛋白的报道。采用凝胶柱层析确定该携脂蛋白的相对分子质量为 638 kD, 它是由分别为 240 kD 和 52 kD 的两个亚基组成 。整体分子中含有 52.8% 的蛋白和 47.2% 的脂类 。苏丹黑 B 和希夫氏试剂染色显示阳性, 说明它是一种糖脂复合蛋白。采用超速离心确定它的密度为 1.11 g/mL, 表明它是一种高密度的脂蛋白。

关键词: 日本松针瘿蚊; 携脂蛋白; 高密度脂蛋白; 越冬幼虫
中图分类号: Q966; Q956 **文献标识码**: A

脂类在昆虫中参与许多生理作用, 在结构、功能、行为和能量代谢上均发挥重要作用。脂类是在水溶液环境状态下运输的, 这可以通过广泛存在于血淋巴内的一种特殊蛋白, 即携脂蛋白的运输来实现。携脂蛋白是一个动态的颗粒, 它作为脂类运输的穿梭工具, 在脂类合成的部位装载它所运输的脂类, 而在脂类的储存器官或其它的外周组织如飞行肌和卵巢等卸下它所装载的脂类, 然而它的整体结构保持完整, 即它完成上述功能是在没有破坏携脂蛋白的基本骨架结构, 它可以在富含脂类和缺少脂类的两种状态下来回穿梭[1]。

携脂蛋白是存在于昆虫血淋巴内, 在成虫组织器官 (如飞行肌和卵巢等) 间运输脂类的一种穿梭工具[2,3]。一般而言, 携脂蛋白由 2 个亚基 apoLp-Ⅰ和 apoLp-Ⅱ组成[2,4], 当往昆虫体内注射激脂激素 (adipokinetic hormone) 或在飞行中, 第三个亚基 apoLp-Ⅲ结合于携脂蛋白, 更有利于脂类的运输[5]。

携脂蛋白主要由脂肪体合成, 然后释放到血淋巴内, 在成虫发生时被发育着的卵巢和精巢吸收[2,6]。携脂蛋白的前体是在携脂蛋白的合成器官——脂肪体经断裂成 2 个亚基 apoLp-Ⅰ和 apoLp-Ⅱ的。

携脂蛋白大都是通过采用大量收集昆虫血淋巴, 直接经密度梯度超速离心分离而来。但是直接从日本松针瘿蚊 *Thecodiplosis japonensis* 等极微小昆虫收集足够的血淋巴是极其困难的。迄今, 仅分别从果蝇 *Drosophila melanogaster* 幼虫和成虫整体内分离纯化了两种携脂蛋

基金项目: 中韩国际合作项目和农业虫鼠害综合治理研究国家重点实验室资助课题
收稿日期: 1999-07-07; 修订日期: 1999-12-28

白[7,8]。从一些忍耐结冰的越冬昆虫如大蚊 *Tipula trivittata* 幼虫体内已分离纯化了具有冰核活性的携脂蛋白[9,10]。众所周知，越冬昆虫的最佳存活是发生在一较狭窄的降温速率范围内，降温太快，可能导致细胞内结冰；降温太慢，可能发生细胞内外的渗透压，这两种情况，都产生很高的越冬死亡率。越冬昆虫为了安全顺利的越冬，可通过冰核物质和抗冻物质（包括抗冻蛋白）的组合灵活地调节体内温度变化达到安全越冬[10,11]。日本松针瘿蚊以3龄老熟幼虫在浅层土表采用避免结冰的对策越冬，越冬季节幼虫体内聚集高含量的携脂蛋白[12]。

本文首次报道日本松针瘿蚊幼虫整体携脂蛋白的分离和纯化，同时对其性质进行了研究，初步阐明了携脂蛋白在越冬抗寒中的潜在生理作用。

1 材料与方法

1.1 试剂

Sepharose CL-4B 和 Sepharose 6B 购自 Pharmacia Biotech（Uppsala，Sweden）。XPERTEK 超离心滤膜购自 P. J. Cobert Associates Inc.（Louis，Mo. USA)，截留分子量为 10 kD。透析袋购自 Merck 公司（德国)，截留分子量为 10 kD。其它的试剂从 Sigma 公司购得。

1.2 供试虫源

3龄老熟越冬松针瘿蚊 *T. japonensis* 幼虫采自 1997/1998 越冬季节的虫瘿。自虫瘿收集到的幼虫直接置于 −73℃ 的低温冰箱冷冻保存待用。采用电泳方法确证低温冷冻对体内的携脂蛋白无影响，没有降解和其它性质的改变。采用低温冷冻，一方面有利于材料的富集，另一方面有利于后续步骤的分离纯化。

1.3 携脂蛋白的纯化

步骤1：KBr 密度梯度超离心：1.20 g 冷冻的越冬老熟幼虫在4℃预冷的 10 mL 抽提液中匀浆，匀浆采用 Ultra-Turrax 匀浆器（Janke & Kunkel，German)，转速为 13 500 r/min，时间为 1.5 min。抽提液组成是：50 mmol/L PBS，pH 7.0，内含 150 mmol/L NaCl，2 mmol/L EDTA，2 mg/mL 还原型谷胱甘肽，0.01%叠氮钠，1 mmol/L PMSF，1 mmol/L 苯脎脒和一定量的蛋白酶抑制剂片（protease inhibitor cocktail tablets)。匀浆液在 4℃ 18 000 r/min 离心 30 min，所使用的离心机是美国 Dupont 公司的 Sorvall RC 28S，转头是 SS-34 型。小心收集上清液，注意不要搅动离心管顶端上浮的脂层。蛋白上清液在 4℃，80%硫酸铵饱和度下沉淀，经离心（按上述同样的条件）所得到的沉淀重新溶解于2倍体积的抽提液中。然后根据 Shapiro 等[4]的方法，进行携脂蛋白的 KBr 密度梯度超离心。按 5 mL 抽提液加入 2 mg 的 KBr 的比例，调节其密度为 1.31 g/mL，将上述溶液（19.5 mL）置于 39 mL Beckman Quick-Seal 离心管内，再在其上覆盖等体积，密度为 1.007 g/mL 新配制的缓冲液。该缓冲液的组成为：50 mmol/L PBS，pH 7.0，内含 125 mmol/L NaCl，2 mmol/L EDTA 和 0.01%叠氮钠。将上述密封的离心管置于 Beckman Model L8-70R 超速离心机，采用垂直转头 VTi 50，在 50 000 r/min 8℃，离心 5 h。在离心过程中采用缓慢加速和减速的方式。超速离心后，可清晰地看到浅黄色的携脂蛋白带，收集该带于透析袋中，对双蒸水进行透析 24 h。所得到的成分按上述同样方法进行第二次超速离心。

步骤2：Sepharose CL-4B 凝胶过滤层析：上述超离心所得到的物质，经冷冻干燥后，溶

于适量的 50 mmol/L PBS，pH7.0 缓冲液中，进行 Sepharose CL-4B 凝胶层析（100 cm × 2.0 cm）。平衡液和洗脱液均是 50 mmol/L PBS，pH7.0，流速为 40 mL/h，按 2 mL/管收集，在 280 nm 下监测洗脱情况。合并同一吸收峰冷冻干燥后，对 0.5 mol/L Tris-HCl（pH 6.8）进行透析，然后再一次冷冻干燥。

1.4　确定携脂蛋白的密度

纯化的携脂蛋白密度的测定采用重量分析法。即首先按照上述密度梯度超离心条件纯化后的携脂蛋白，然后按 1 mL/管连续收集分离后的样品，测定每管的 OD 280 吸收值，同时测定每管的重量计算它的密度，根据 OD 最高吸收值确定携脂蛋白的密度。

1.5　凝胶电泳

采用凝胶电泳的方法监测携脂蛋白的纯化进程。变性条件下的电泳（SDS-PAGE）按照 Laëmmli[13]方法，分离胶 7.5%，浓缩胶 4.0%，采用 HOEFER SE260 Mighty Small 电泳系统，按 9 V/cm 的恒压进行电泳。电泳后按照常规的考马斯亮兰 R-250 方法[14]或 Bio-Rad 银染试剂盒[15]染色。电泳后蛋白质分子量的测定采用 Lambin 等[16]方法。标准分子量包括肌球蛋白（200 kD）、磷酸化酶 b（97.4 kD）、牛血清清蛋白（66.2 kD）和卵清蛋白（45.0 kD）。

天然条件下的电泳采用 Davis 等[17]的方法。胶浓度为 4% 或 5%。按照 Bianchi 等[14]方法进行常规的考马斯亮兰 R-250 染色；按照 Fairbanks 等[18]方法进行糖蛋白的染色，即过碘酸-希夫氏试剂染色；脂蛋白染色按照以下方法进行：电泳后的凝胶置于苏丹黑 B 染色液中染色 15 min，再置于脱色液中脱色。

1.6　携脂蛋白的分子量测定

适量纯化后的携脂蛋白溶解于平衡液中（50 mmol/L Tris-HCl，pH7.5，内含 100 mmol/L NaCl），然后过 Sepharose 6B 凝胶柱（1.6 cm × 100 cm）。洗脱条件：洗脱缓冲液 50 mmol/L Tris-HCl，pH7.5，内含 100 mmol/L NaCl；洗脱流速 25 mL/h；每管收集量 2.5 mL。在 280 nm 下监测洗脱峰。标样购自 Sigma 公司高分子量试剂盒（MW-GF-1000 Kit）。

1.7　脂类的抽提和定量

携脂蛋白所包含的脂类的抽提按照 Folch 等[19]的方法确定。脂类的定量测定按照 Lavy 和 Verhoef[20]的方法，以胆固醇（Sigma）做为定量的标准。

1.8　总蛋白含量的测定

总蛋白的含量按照 Bradford[21]的方法，标准蛋白是 Sigma 公司的牛血清清蛋白。

2　结果

运用 KBr 密度梯度超速离心并结合凝胶过滤法从日本松针瘿蚊越冬 3 龄老熟幼虫整体分离并纯化出了携脂蛋白。

匀浆后的粗蛋白，经 80% 饱和度的硫酸铵沉淀，得到的蛋白经透析后，再经 KBr 密度梯度超离心，在离心管的上半部出现了一浅黄色的带（结果未列出）。这是由于瘿蚊取食时从松针中吸收的类胡萝卜素，被携脂蛋白分子所捕获的缘故，在许多植食性昆虫的携脂蛋白均发现这种情况[4]。收集浅黄色带经透析脱盐，过 Sepharose CL-4B 凝胶柱，除了几个微量的蛋白杂峰外，仅得到一个大的蛋白主峰（图 1）。从电泳图上看，已得到了纯化的携脂蛋白（图 2，

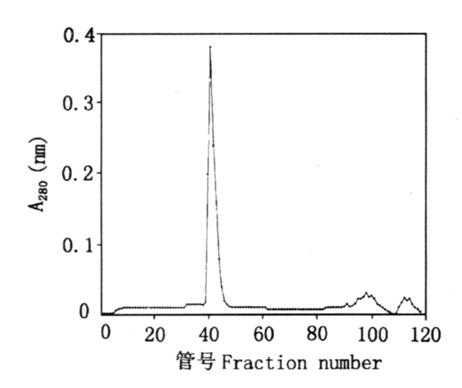


图1 Sepharose CL-4B (100 cm×2.0 cm) 凝胶过滤层析法纯化携脂蛋白

Fig. 1 Sepharose CL-4B (100 cm×2.0 cm) gel filtration chromatography of the lipophorin from KBr density gradient ultracentrifugation

平衡液和洗脱液均是0.05 mol/L PBS, pH7.0; 流速为40 mL/h; 每管收集2.0 mL, 在280 nm测定其吸收值

The gel was eluted with 0.05 mol/L PBS (pH7.0) at the rate of 40 mL/h, and the elutes were collected in 2.0 mL fraction

图3)。80%饱和度硫酸铵的沉淀液和纯化过程中的蛋白经凝胶电泳和SDS凝胶电泳确证纯化度。从非变性电泳图谱可看出，经第一次超速离心，得到一个扩散的主带，同时伴随一些较弱的迁移率很快的蛋白带。经第二次超速离心，并不能移除上述杂蛋白带，但是能得到较窄的主带。从电泳图谱上可看出，经Sepharose CL-4B凝胶过滤可移除杂蛋白带(图2)。变性电泳图谱上可得出同样的结果(图3)：显示两个亚基，命名为apoLp-Ⅰ和apoLp-Ⅱ，分子量分别为240 kD和53 kD。从图上可发现大亚基apoLp-Ⅰ的电泳行为，该带出现了扭曲，表明发生了部分降解。这种现象在其它几种昆虫的携脂蛋白也有类似报道[22]。

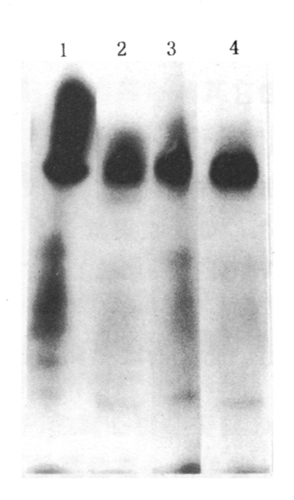


图2 聚丙烯酰胺凝胶(4.0%分离胶)电泳，示纯化的携脂蛋白

Fig. 2 Native polyacrylamide gel electrophoresis (4%T)

1：80%饱和硫酸铵的沉淀物；
2：第一次超离心的蛋白带；
3：第二次超离心的蛋白带；
4：SepharoseCL-4B凝胶过滤层析后的主吸收峰

Lane 1：80% $(NH_4)_2SO_4$ precipitated material;
lane 2：band of the first ultracentrifugation;
lane 3：band of the second ultracentrifugation;
lane 4：main peak of Sepharose CL-4B gel filtra-tion chromatography

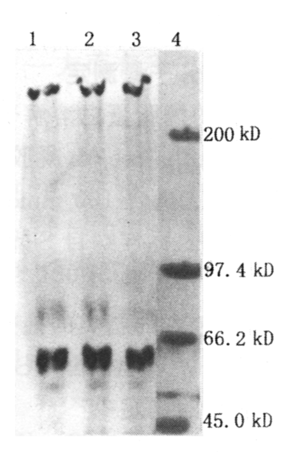


图3 SDS聚丙烯酰胺凝胶(4.0%堆积胶，7.5%分离胶)电泳，示纯化的携脂蛋白

Fig. 3 SDS slab gel electrophoresis (7.5% separating gel, 4% stacking gel)

1：第一次超离心的蛋白带；2：第二次超离心的蛋白带；
3：Sepharose CL-4B凝胶过滤层析后的主吸收峰；
4：标准分子量：肌球蛋白200 kD、磷酸化酶b 97.4 kD、牛血清清蛋白66.2 kD和卵清蛋白45.0 kD

lane 1：band of the first ultracentrifugation;
lane 2：band of the second ultracentrifugation;
lane 3：main peak of Sepharose CL-4B gel filtration chromatography;
lane 4：molecular weight standard (myosin 200 kD; phosphorylase b 97.4 kD; bovineserum albumin 66.2 kD; ovalbumin 45.0 kD

采用 Sepharose 6B 凝胶过滤柱，按照半对数做图法，确定携脂蛋白的天然分子量是 638 kD（图 4）。电泳后，对携脂蛋白进行不同性质的染色（图 5）：苏丹黑染色显示阳性，说明它是一种脂蛋白；希夫氏试剂染色显示阳性，说明它是一种糖蛋白。室温下，采用重量分析法，确定纯化后的携脂蛋白的密度是 1.11 g/mL（图 6）。因而该携脂蛋白是一种高密度的糖脂复合蛋白。

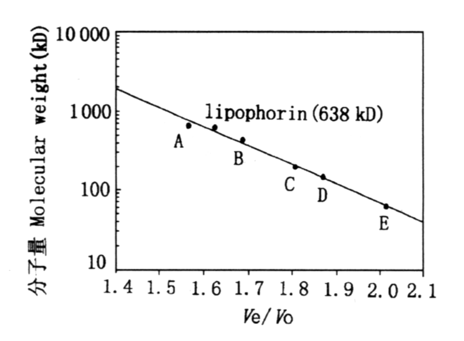


图 4　Sepharose 6B（100 cm×1.6 cm）凝胶过滤层析法确定纯化后的携脂蛋白的天然分子量（标准蛋白购自 Sigma MW-GF-1000Kit）

Fig. 4　Determination of native moleular weight of purified lipophorin by gel filtraton chromatography. Calibration curve obtained with proteins from Sigma MW-GF-1000Kit as run on Sepharose 6B (100 cm×1.6 cm)

平衡液和洗脱液均是 50 mmol/L Tris-HCl，pH7.5，内含 100 mmol/L NaCl；流速为 25 mL/h；每管收集 2.5 mL，在 280 nm 测定其吸收值，根据最高吸收值，确定洗脱体积。按半对数作图法，确定携脂蛋白的天然分子量。A：甲状腺球蛋白（669 kD）；B：脱铁铁蛋白（443 kD）；C：β-淀粉酶（200 kD）；D：醇脱氢酶（150 kD）；E：牛血清清蛋白（66 kD）

The gel was equilibrated and eluted with 50 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, containing 100 mmol/L NaCl, at a flow rate of 25 mL/h, with 2.5 mL fraction collected. A: thyroglobulin 669 kD; B: apoferritin 443 kD; C: β-amylase 200 kD; D: alcohol dehydrogenase 150 kD; E: bovine serum albumin 66 kD

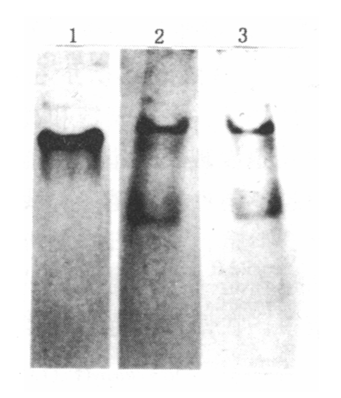


图 5　对 5%聚丙烯酰胺电泳后的携脂蛋白带进行不同性质的染色

1. 对考马斯亮兰；2. 苏丹黑 B；3. 希夫氏试剂

Fig. 5　Staining native polyacrylamide gel (5%T) of lipophorin by Coomassie Brilliant Blue (1), Sudan Black B (2), and Schiffs' reagent (3)

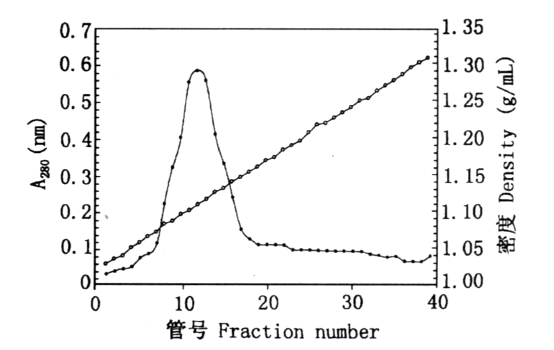


图 6　超速离心确定纯化后的携脂蛋白密度

Fig. 6　Density determination of purified lipophorin

携脂蛋白首先在 KBr 密度梯度下超速离心。离心后，按每管 1 mL 自上向下取样，在 280 nm 测定其吸收值，同时按重量法确定其密度

Lipophorin was centrifuged in a KBr density gradient as described. Fractions (1 mL/fraction) were collected from the top of the tube. The absorbance at 280 nm and density of each KBr fraction were determined at room temperature

从以上对纯化的日本松针瘿蚊越冬幼虫携脂蛋白所进行的性质分析，表明它具备昆虫携脂蛋白一般性质，更加证明它是一种携脂蛋白[1]。

做为运输脂类的一种功能蛋白，携脂蛋白主要由蛋白和脂类成分组成。按照重量组成分析，纯化的日本松针瘿蚊越冬幼虫携脂蛋白由52.8%总蛋白和47.2%的总脂类组成。

3 讨论

自昆虫体内发现携脂蛋白以来，对其生物化学结构和运输携带不同类别的脂类的生理功能进行了研究。一般而言，携脂蛋白的天然分子量在500～650 kD范围内，由两大经糖化的亚基apoLp-Ⅰ和apoLp-Ⅱ组成，分子量大约是240 kD和80 kD（表1）[4,23]。按重量计，携脂蛋白天然分子中含有35%～59%的的脂类，其中二酰基甘油酯、磷脂类和脂肪烃类是主要成分，而胆固醇和三酰基甘油酯是次要成分[1]。本文中，我们从越冬日本松针瘿蚊幼虫整体内提取并纯化了携脂蛋白。该携脂蛋白同其它昆虫体内的同类蛋白比较具有同样的理化特征：相对分子质量为638 kD，由分子量分别为240 kD亚基apoLp-Ⅰ和52 kD的亚基apoLp-Ⅱ组成。整体分子中含有52.8%的蛋白和47.2%的脂类，是一种密度为1.11g/mL的高密度脂蛋白。但本文中，松针瘿蚊携脂蛋白的小亚基apoLp-II分子量较同类常规的携脂蛋白要小，可能同它低温下体内携带运输脂类不很活跃有关[1]。

表1 部分已分离纯化的携脂蛋白的亚基组成

Table 1 The subunit composition of some purified lipophorins

昆虫种类 Species	亚基分子量 Subunits Mol. Wt. (kD) ApoLp-Ⅰ	ApoLp-Ⅱ	参考文献 Reference
埃及伊蚊 *Aedes aegypti*	240	70	[24]
德国小蠊 *Blattella germanica*	212	71	[25]
果蝇 *Drosophila melanogaster*	240	75	[8]
蜡螟 *Galleria mellonella*	220	78	[26]
美国白蛾 *Hyphantria cunea*	230	80	[27]
大蚕蛾 *Hyalophora cecropia*	242	76	[6]
瘿蚊 *Thecodiplosis japonensis*	240	52	本文

日本松针瘿蚊是采用避免体内结冰的对策，以3龄老熟幼虫在浅层土表安全越冬的，在越冬季节，除在体内聚集高含量的抗冻保护性物质——海藻糖和高热滞活性的热滞蛋白外，体内同时也聚集高含量的携脂蛋白[12]。一些报道发现，携脂蛋白能作为一种冰核剂诱导细胞外冰晶的形成，而保护采取忍耐结冰对策的越冬昆虫安全越冬。我们测定了该携脂蛋白的热滞行为，没有发现它具备该方面的典型特性，但是，是否日本松针瘿蚊的携脂蛋白在越冬季节参与体内脂肪酸，尤其是非饱和脂肪酸的运输是一个值得关注的问题。另外，松针瘿蚊的携脂蛋白可能类似于其它越冬昆虫的携脂蛋白，在调节细胞内外渗透压以及水分的平衡发挥着重要作用，这都待进一步研究。

参 考 文 献 (References)

[1] Van der Horst D J *et al*. Lipophorins and lipid transport. In: Samueloson D W S, Nelson D R eds. Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry and Biology. London: University of Nebraska Press, 1993, 1～24

[2] Chino H, Downer R G H. Insect hemolymph lipophorin: a mechanisms of lipid transport in insects. Adv. Biophys., 1982, 15: 67～92

[3] Beenakkers A M Th *et al*. Lipophorin nomenclature. Insect Biochem., 1988, 18: 1～2

[4] Shapiro J P *et al*. Structure studies on lipophorin, an insect lipoprotein. J. Biol. Chem., 1984, 259: 3 680～3 685

[5] Haunerland N H, Bowers W S. Binding of insecticides to lipophorin and Arylphorin. Two hemolymph proteins of *Heliothis zea*. Arch. Insect Biochem. Physiol., 1986, 3: 87～96

[6] Telfer *et al*. Lipophorin in developing adults of *Hyalophoria cecropia*: Support of yolk formation and preparation for flight. Insect Biochem., 1991, 21: 653～663

[7] Fernando－Warnakulasuriya G J P, Wells M. Isolation and characterization of lipophorin from *Drosophila melanogaster* larvae. Arch Insect Biochem. Physiol., 1988, 8: 143～148

[8] Pho D B *et al*. Purification of adult *Drosophila melanogaster* lipophorin and its role in hydrocarbon transport. Arch. Insect Biochem. Physiol., 1996, 31: 289～303

[9] Duman J G *et al*. Freeze tolerance adaptations, including hemolymph protein and lipoprotein ice nucleators, in the larvae of the cranefly *Tipula trivittata*. J. Insect Physiol., 1985, 31: 1～8

[10] Duman J G *et al*. Hemolymph proteins involved in insect subzero-temperature tolerance: ice nucleators and antifreeze proteins. In: Lee R E, Denlinger D L eds. Insect at Low Temperature. Chapman and Hall, New York and London. 1991, 94～130

[11] Lee R E Jr, Costanzo J P. Biological ice nucleation and ice distribution in cold-hardy ectothermic animals. Ann. Rev. Physiol., 1998, 60: 55～72

[12] 李毅平. 博士学位论文：昆虫耐寒的生化及分子机理. 北京：中国科学院动物研究所. 1999

[13] Laëmmli O K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, 227: 680～685

[14] De Bianchi A G *et al*. Vitellogenesis and other haemolymph proteins involved in the oogenesis of *Rhynchosciara americana*. Insect Biochem., 1982, 12: 177～182

[15] Gottlieb M, Chavko M. Silver staining of native and denatured eucaryotic DNA in agrose gel. Anal. Biochem., 1987, 165: 33～37

[16] Lambin P *et al*. A new method for detection of molecular weights of proteins by electrophoresis across a sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gradient gel. Anal. Biochem., 1976, 74: 567～575

[17] Davis B J. Disc electrophoresis. II Methods and applications to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. U. S. A., 1964, 121: 404～427

[18] Fairbanks G *et al*. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochemistry, 1971, 10: 2 606～2 617

[19] Folch J *et al*. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissue. J. Biol. Chem., 1957, 226: 497～509

[20] Lavy D, Verhoef H A. Effects of food quality on growth and body composition of the collembolan *Orchesella cincta*. Physiol. Entomol., 1996, 21: 64～70

[21] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem., 1976, 72: 248～253

[22] King L E, Tobe S S. The structure of a juvenile hormone-binding lipophorin from the hemolymph of *Diploptera punctata*. Insect Biochem., 1992, 23: 817～827

[23] Ryan R O. Dynamics of insect lipophorin metabolism. J. Lipid Research, 1990, 31: 1 725～1 739

[24] Ford P S, Van Heusden M C. Triglyceride-rich lipophorin in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol., 1994, 31: 435～441

[25] Gu X *et al*. Biosynthesis of hydrocarbons and contact sex phermone and their transport by lipophorin in females of the German cockroach (*Blattella germanica*). J. Insect Physiol., 1995, 41: 257～267

[26] Yun K H, Lee S G. Purification and characterization of lipophorin in wax moth, *Galleria mellonella*. Korean J. Entomol., 1997, 27: 257～263

[27] Yun K H *et al*. Characterization and biosynthesis of lipophorin in *Hyphantria cunea*. Korean J. Entomol., 1996, 26: 385～392

Purification and characterization of lipophorin from overwintering mature larvae of pine needle gall midge, *Thecodiplosis japonensis* (Diptera: Cecidomiidae)

LI Yi-ping[1], GONG He[1], Park Ho-yong[2]

(1. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080; 2. Insect Resources Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P. O. Box 115, Yusong, Taejon 305-600, Korea)

Abstract: A lipophorin was isolated and purified from whole body of third instar mature larvae of pine needle gall midge, *Thecodiplosis japonensis* (Uchida *et* Inouye) by KBr density gradient ultracentrifugation and Sepharose CL-4B gel permeation. It is the second lipophorin that have been purified from whole body. The native molecular weight was 638 kD by gel permeation chromatography. It was composed of two subunits, named as apoLp-Ⅰ and apoLp-Ⅱ, with molecular weight of 240 kD and 52 kD respectively. The holoprotein contained 52.8% protein and 47.2% lipid by weight. Sudan Black B and Periodic acid/Schiffs' reagent staining showed positive results, indicating a kind of glycolipoprotein. Its density was 1.11 g/mL, showing a kind of high density lipoprotein. The presence of high content of lipophorin in whole-body of third instar, suggesting a potential role in lipid transport and/or cryoprotection during the overwintering periods.

Key words: *Thecodiplosis japonensis*; lipophorin; high density lipoprotein; overwintering larvae